Aus dem med.-klin. Institut der Universität München.
(Professor Dr. Friedrich v. Müller.)

Ueber das Verhalten der Serumeiweisskörper gegen Trypsin.

■ ■ ■

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

einer

Hohen medizinischen Fakultät

der

Kgl. bayer. Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Ludwig Aubry
Medizinalpraktikant.

ACAD.
LUDOVIC.
BIBL.

■ ■ ■

München 1913
RUDOLPH MÜLLER & STEINICKE

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München.

Referent: Herr Geheimrat Professor Dr. Fr. v. Müller.

Zweck der vorliegenden Untersuchungen, die im Winter 1911/12 am Medizinisch-Klinischen Institut zu München ausgeführt wurden, war es, festzustellen, in welcher Weise sich die Serumeiweißkörper, Albumine und Globuline, an der Hemmung, die Serum auf die Trypsinverdauung ausübt, beteiligen und welchen Einfluß vor allem die Inaktivierung des Serums durch Wärme hat. Die Arbeit beschränkte sich im Wesentlichen auf das Studium des Verhaltens gegen Pankreastrypsin. Einige Versuche mit einem Bakterienferment wurden nur zum Zweck eines andeutungsweisen Vergleiches angestellt.

Methodik.

Die nächstliegende Forderung für eine derartige Untersuchung war die quantitative Trennung der Eiweißkörper des Serums. Abgesehen von einer großen Anzahl meist recht umständlicher Methoden, die im großen und ganzen auf der verschiedenen Ausfällbarkeit der Albumine und Globuline mit Salzlösungen (Ammoniumsulfat, Magnesiumsulfat usw.) beruhen, verdient eine in der jüngsten Zeit von Kämmerer ausgearbeitete einfache Technik als für diese Zwecke sehr entsprechend hervorgehoben zu werden.

Für Trypsinversuche mit den Eiweißkörpern sind hauptsächlich zwei Bedingungen zu erfüllen: einerseits die einer möglichst genauen Trennung der Albumine von den Globulinen und andererseits die Anwendbarkeit der Methode selbst bei kleinen Serummengen, was insbesondere für eventuelle klinische Brauchbarkeit von Wichtigkeit ist. Außerdem hat eine rasch ausführbare Trennung den großen Vorzug gegenüber den Methoden, die eine mehrere Tage lang dauernde Behandlung notwendig machen, daß wesentliche Veränderungen der gegen äußere Einflüsse ziemlich empfindlichen Hemmungsstoffe hier weniger leicht eintreten können.

Eine Publikation von Hugo Wiener, Prag, „Ueber quantitative Globulin - Bestimmungen mittels Ammoniumsulfat und über Reindarstellung von Globulinen“ [1]) ist mir erst nach Fertigstellung der Arbeit bekannt geworden, sodaß ihre bemerkenswerten Ergebnisse nicht mehr berücksichtigt werden konnten.

[1]) Zeitschrift für physiologische Chemie Bd. 74, Seite 29.

Es handelt sich bei der Arbeit von Wiener im wesentlichen um folgendes: Entgegen der früheren Annahme, daß im unverdünnten Serum durch einen bestimmten Ammoniumsulfatzusatz nur die Eiweißkörper ausfielen, die eben dieser Konzentration entsprechen, kommt Wiener auf Grund einer Reihe von Versuchen zu dem Ergebnis, daß es nicht möglich sei, im konzentrierten Serum einen bestimmten Eiweißkörper z. B. die Globuline quantitativ auszufüllen, da hiebei auch Eiweißkörper mitgerissen würden, die erst bei viel höherer Konzentration fällbar sind. Auf diese Weise erhielte man im konzentrierten Serum zu hohe Werte. Dadurch, daß man das Serum aber vorher ziemlich stark (16—25 fach) verdünne, sei es möglich, genaue Resultate zu erhalten, da die Fraktionen höherer Fällbarkeit nun nicht mehr mitgerissen werden könnten und nur noch der eben bei der angewandten Konzentration fällbare Körper ausfalle. Wiener kommt zu dem Resultate, daß die Werte im verdünnten Serum (also die richtigen) nur za. 80 Prozent jener im unverdünnten Serum betrügen. Durch einfaches Auswaschen des Niederschlags, der aus unverdünntem Serum gewonnen ist, sei es nachträglich nicht mehr möglich, die richtigen Werte zu bekommen.

Wenn sich tatsächlich in allen Fällen derartige Differenzen ergeben sollten, so würden möglicherweise auch die vorliegenden Resultate in ihren Zahlenwerten etwas zu modifizieren sein; an dem Prinzip ändern sie jedoch insoferne nichts, als, wie sich im folgenden zeigen wird, im wesentlichen das qualitative Verhalten der Fraktionen festgestellt werden sollte und dabei geringe quantitative Unterschiede von Albumin und Globulin keine Rolle spielen.

Die angeführte Methode nach Kämmerer wird ungefähr folgendermaßen ausgeführt: Zu einer bestimmten Menge Serum setzt man die gleiche Menge einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung und zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit enthält die Albumine, der Bodensatz, der nun einigemale mit halbgesättigter Ammoniumsulfatlösung gewaschen wird, stellt die Globuline dar. Für Einzelheiten der Technik verweise ich auf die Untersuchungen von Kämmerer und Mogulesco in der Arbeit „Ueber die Antitrypsine des Serums gegen Pankreas-, Hefe- und Pyocyaneustrypsin,“ [2]) wo sich auf S. 20/21 die genaue Angabe der Ausführung findet. Nach dieser Methode wurden die Albumin- und Globulin-Fraktion auch für die folgenden Untersuchungen ausschließlich dargestellt.

Was die Technik anlangt, mit der die Verdauungsversuche selbst ausgeführt wurden, so benützte ich die Antitrypsinmethode

[2]) Zeitschrift für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie. Bd. XII Heft 1, 1911.

Volhard-Kämmerer. Sie macht es möglich, selbst noch geringere Ausschläge zahlenmäßig auszudrücken durch Anwendung der Titration.

Im folgenden soll auf die Methode, die in der Arbeit von Kämmerer „Studien über die Antitrypsine des Serums“ [3]) veröffentlicht ist, in einigen Punkten noch näher eingegangen werden, und zwar erübrigt es neben der Darlegung der im speziellen verfolgten Technik auf einige vielleicht nicht unwichtige Dinge hinzuweisen, die sich im Verlauf der Untersuchungen als beachtenswert herausgestellt haben.

Als Ferment benutzte ich das pulverisierte Trypsin-Grübler, das dunkel aufbewahrt, während der mehrere Monate beanspruchenden Untersuchungen eine große Konstanz des Titers aufwies. Es wurde ausschließlich mit einer 2 prozentigen Lösung gearbeitet. Dieselbe wurde mit Hilfe einer Stammlösung von 1 Prozent in physiologischer Kochsalzlösung hergestellt, welche letztere zur Erreichung leichter Löslichkeit des Trypsins durch Zusatz von 1 Prozent Normal - Soda - Lösung alkalisch gemacht wurde. Diese 1 prozentige Trypsinlösung wurde wenige Stunden vor Benützung hergestellt und im Frigo in geschlossener Flasche aufbewahrt. Auf diese Weise wurde die völlige Auflösung des Trypsins erzielt. Das Trypsin-Grübler hat vor Trypsin-Merck den Vorzug, daß es sich vollkommen glatt löst und man daher ganz sicher sein kann, daß eine vorher abgewogene Menge der trockenen Substanz auch wirklich in der schließlich benützten Fermentlösung enthalten ist. Man weiß damit auch genau, wieviel man dem einzelnen Versuch zugesetzt hat, wodurch die Fehlerquellen, die durch ungelöste Partikelchen entstehen könnten, ausgeschaltet sind. Es genügten fast durchweg 0,5 g Trypsin, aufgelöst in 49 ccm Na Cl unter Zusatz von 0,5 Normal-Sodalösung, als Stammlösung. Erst kurz vor dem Einfüllen in die Kölbchen zum Versuch wurde die 2 prozentige Lösung hergestellt. Die Stammlösung kann, im Frigo aufbewahrt, ohne nennenswerten Rückgang des Titers, auch noch am folgenden Tag zu einem weiteren Versuche Verwendung finden.

Bezüglich des Bakterienfermentes wird an späterer Stelle näheres Erwähnung finden.

Für das Verdauungsgemisch verwendete ich anfänglich gleich Kämmerer und Mogulesco Casein nach Hammarsten in 5 prozentiger Lösung, deren Herstellung in der in erwähnter Arbeit angegebenen Weise erfolgte. Später wurde zu den Versuchen 5 prozentige Nutroselösung benutzt. Dieses Präparat hat ganz die gleichen Ergebnisse gezeitigt wie das Casein, nur hat es den Vorteil leichterer Löslichkeit und bedeutend geringeren Preises. Es wurde ganz analog dem Casein aufgelöst (100 Gramm

[3]) Deutsches Archiv für klinische Medizin Bd. 103.

Nutrose auf 2000 ccm aqu. dest. unter Zusatz von 80 ccm Normal-Natronlauge). Jedoch erreicht man bei ihr durch Zusatz der Lauge größere Alkaleszenz und dementsprechend bei der Titration geringere Anfangssäure, was eine weitere Annehmlichkeit des Präparates ist. Für die Vergleichsversuche (Pankreas-Trypsin und Bakterien-Trypsin) mußte wieder Casein Verwendung finden, da — aus vorläufig nicht näher bekannten Ursachen — für das Bakterienferment mit Nutrose keine, auch nur einigermaßen brauchbare Verdauung erzielt werden konnte.

Um möglichst einheitliche Versuchsbedingungen zu bekommen, wurde in allen Kölbchen gleiche Salzkonzentration hergestellt. Am einfachsten geschieht dies folgendermaßen: Nachdem in allen Kölbchen je 20 ccm physiologischer Kochsalzlösung eingefüllt sind, entnimmt man aus den Kontrollkölbchen und denen, in welche Vollserum kommt, je ebensoviele Kubikzentimeter Kochsalzlösung, als dem späteren Antikörperzusatz entsprechen und ersetzt diese durch die gleiche Menge einer Lösung von halbgesättigter Ammoniumsulfat - Lösung in physiologischer NaCl (0,4 : 10,0). Tatsächlich spielt, wie schon Kämmerer und Mogulesco bemerkten, in den starken Verdünnungen das Salz keine Rolle bei der Verdauung.

Die Methode gibt sehr genaue Resultate und ermöglicht vor allem, für jeden Versuch den Trypsintiter exakt festzustellen, wodurch Schwankungen in der Leistung des Fermentes jeweils leicht kontrolliert werden können. Freilich ist es notwendig, eine Reihe von Punkten zu beachten um nicht nur Fehler, sondern auch allzugroße Unregelmäßigkeiten bei den einzelnen Versuchen zu vermeiden.

Wie schon Hedin[4]) durch eingehende Untersuchungen feststellte, ist die Reihenfolge, in der Casein, Trypsin und Antikörper gemischt werden, von ausschlaggebender Bedeutung. Nach seinen Ausführungen entfaltet ein Antiferment eine größere Wirkung, wenn man ihm Gelegenheit gibt, eine gewisse Zeit auf das Ferment allein zu wirken und mit ihm eine — für Casein wenigstens — schwer reversible Verbindung einzugehen. Es hat sich aber in Versuchen von Kämmerer gezeigt, daß gerade Pankreastrypsin schon nach kurzer Bindungszeit bei 37° einen großen Teil seiner Verdauungskraft verliert und daß bei zweistündiger Bindung in Zimmertemperatur keine merklichen Unterschiede gegenüber Kontrollproben auftreten; ich verweise bezüglich dieser Punkte auf die Arbeit von Kämmerer[3]) S. 351 ff. Aus diesen Gründen wurde auch bei meinen Versuchen von einer längeren Bindungszeit kein Gebrauch gemacht, sondern nur eine gewisse Reihenfolge der Mischung eingehalten, nämlich: physio-

[4]) „Ueber verschiedenartige Hemmung der tryphischen Verdauung." Zeitschrift für physiol. Chemie. Bd. 52. 1907.

logische Kochsalzlösung (event. unter Herstellung der nötigen Salzkonzentration mit Ammoniumsulfatlösung), Serum usw. (also Antikörper), Trypsin und erst zum Schluß Casein.

Ganz besondere Beachtung verdient die Kontrolle, welche dazu bestimmt ist, den Säuregehalt des Gemisches ohne Digestion festzustellen. Es wird hier leicht der Fehler gemacht, daß man dieses Kölbchen nach dem Caseinzusatz noch einige Zeit stehen läßt, bevor man die Ausfällung vornimmt. Währenddessen hat das sehr kräftig wirkende Ferment, das selbst schon bei Zimmertemperatur seine Wirkung entfaltet, Gelegenheit, einen gewissen Teil des Caseins anzugreifen. Gerade im Beginne ist die Verdauungskraft eine bedeutende, wie leicht zu ersehen ist aus der in oben genannter Arbeit von K.[3]) S. 373 enthaltenen Figur. Es zeigt sich hier, daß die Verdauung in einer ansteigenden und später flach verlaufenden Kurve vor sich geht.

Man kann auf diese Weise leicht eintretende Fehler dadurch vermeiden, daß man sofort nach dem Einfüllen des Caseins in diesem Kölbchen mit Natriumsulfat und Salzsäure ausfällt. Dadurch wird der Säuregehalt des Verdauungsgemisches dann exakt festgestellt. Es ist dies sehr wichtig, da sonst der Wert für V d. i. die Größe der Verdauung ungenau wird. Die Titration dieses Kölbchens könnte in dem Filtrate selbstverständlich sofort vorgenommen werden, jedoch hat es sich als zweckmäßiger ergeben, alle Kölbchen zusammenzutitrieren, um die völlige kolorimetrische Uebereinstimmung erreichen zu können. Dies ausgefällte Kölbchen ist, um Verdunstung zu verhindern, mit einem Gummipfropf fest zu verschließen und am besten kühl aufzubewahren. Noch sicherer ist es vielleicht, vom Niederschlag abzufiltrieren und nur das Filtrat unter den gleichen Kautelen aufzubewahren, bis auch die übrigen Werte titriert werden können. Bei kurzen Verdauungszeiten, wie sie hier mit Trypsin nur notwendig waren, — ausschließlich eine Stunde — spielen diese letzteren Momente ja nicht eine so große Rolle wie bei langen Verdauungszeiten.

Einen weiteren Anlaß, wenn auch nicht gerade zu Fehlern, so doch zu beträchtlichen Schwankungen in den Versuchen gibt wechselnde Alkalität der Caseinlösung. Wie aus der Angabe der Volkhard'schen Vorschrift bei Kämmerer ersichtlich, wird der Caseinlösung eine beträchtliche Menge Lauge zugesetzt und dadurch auch eine starke Phenolphtaleinalkalität erreicht. Vergleicht man nun die Anfangssäuren einer größeren Reihe von Versuchen, die sich über längere Zeit erstrecken, so kann man beobachten, daß anfänglich die Werte äußerst konstant bleiben, bis von einem gewissen Punkte an sich successive höhere Anfangssäuren ergeben. Die Verdauungswerte gehen etwas zurück. Eine Probe der Caseinlösung mit einigen Tropfen Phenolphthalein versetzt, wird die Ursache der Erscheinung leicht

erklären. Während bei der frisch hergestellten Caseinlösung deutliche Rötung auftrat, ist jetzt vielleicht überhaupt keine oder nur eine ganz schwache Färbung zu erzielen. Erst auf nachträglichen Zusatz von Alkali erscheint sie.

Man könnte nun einfach in eine abgemessene und mit einigen Tropfen Phenolphthalein versetzte Probe der Caseinlösung aus einer Bürette so viel $^1/_{10}$ Normalnatronlauge zulaufen lassen, bis deutliche Rotfärbung eintritt. Dann bräuchte man nur auf die noch vorhandene Menge der Caseinlösung umzurechnen und das nötige Alkali in Form von $^1/_1$ Normalnatronlauge zuzusetzen. Da aber diese Methode doch etwas ungenau ist, so wäre es vielleicht mehr zu empfehlen, jede frisch bereitete Caseinlösung mit $^1/_{10}$ Normalsalzsäure gegen Phenolphthalein zu titrieren und von Zeit zu Zeit dasselbe zu wiederholen, um dann event. die Alkalität in der Lösung wieder herzustellen. Freilich hat bei einmal eingetretener Säuerung ein nachheriger Alkali-Zusatz meist nur für kurze Zeit Wirkung. Auf die angegebene Weise wird es gelingen, die oft ganz unerklärlichen Schwankungen von Anfangssäure und Verdauung in vielen Fällen auf ein Minimum reduzieren zu können. Ich möchte jedoch ausdrücklich bemerken, daß sich diese Beobachtungen des Rückganges der Alkaleszenz speziell auf das von mir benützte Casein — Hammarsten — von der Firma Kahlbaum beziehen. Wie sich andere Präparate verhalten, kann ich nicht sagen.

Eine Forderung von großer Wichtigkeit ist es, für vergleichbare Versuchsreihen einigermaßen gleichen Trypsintiter zu haben, was insoferne nicht ganz leicht ist, als die verschiedensten Faktoren dabei eine Rolle spielen: So Reaktion der Lösung, Schwankungen von Zeit und Temperatur bei der Digestion usw. Immerhin kann man einen Ausweg dadurch schaffen, daß man Testseren benützt, die zu jedem Versuche eingestellt werden und dann auch bei größeren Differenzen einigermaßen brauchbare Anhaltspunkte für die Bewertung der Ausschläge geben. Auf die Notwendigkeit der Benützung von Testseren hat schon Kämmerer eindringlich aufmerksam gemacht.

Das Erstrebenswerte wäre ja, ein in seinem Hemmungswert konstantes und sozusagen unbegrenzt haltbares Serum zu gewinnen. Die Versuche, derartige Bedingungen zu erfüllen, sind leider bisher noch nicht gelungen. Während des größten Teiles der vorliegenden Untersuchungen wurde gewöhnliches Pferdeserum benützt, das in Reagenzröhren im Frigo aufbewahrt wurde. Es gefriert jedoch das Serum oft schon sehr bald und ist dann nicht mehr einwandfrei zu gebrauchen, da Niederschläge und damit meist auch ein Rückgang der Hemmung auftreten. Was die Hemmungszahlen betrifft, so wurde bei dem im Laufe der Untersuchung benützten, einer Reihe verschiedener Pferde entstammenden Seren eine auffallende Uebereinstimmung beobach-

tet, ein Punkt, der im schlimmsten Fall die Benützbarkeit an Stelle eines einzigen konstanten Serums immerhin noch angängig erscheinen ließe. Nebenher wurden Versuche mit Testseren angestellt bei verschiedener Konservierung, die jedoch kaum zu besseren Resultaten führten, als sie das einfach unbehandelte, auf Eis gehaltene Serum aufwies. Es wurde daran gedacht, das Serum durch Eindicken auf Sirupkonsistenz einerseits haltbarer zu machen und andererseits eine leichtere Löslichkeit zu bewahren, als sie bei völlig trockenen Seren vorhanden ist. Die Löslichkeit war zwar nach dem Eindampfen auf ca. $^1/_3$ Volumen bei 45° im Faust-Heim'schen Apparat sehr gut und die Hemmungswerte entsprechend und konstant, doch zeigte sich im Frigo auch hier bald Gefrieren und im Eisschrank war die Haltbarkeit eine ziemlich kurze. Weiterhin wurde versucht, das auf $^1/_3$ Volumen eingedickte Serum durch Zusatz von 0,5 Prozent Phenol haltbarer zu machen, jedoch traten meist schon nach 1 bis 2 Tagen Niederschläge auf, die die Benützbarkeit in Frage stellen, obwohl die Hemmungswerte eine große Konstanz aufweisen.

Vorläufig ist also die Frage eines wirklich konstanten Testserums für die Antitrypsinversuche wohl noch nicht völlig gelöst; es läßt sich aber bei der noch vorhandenen Schwierigkeit der Herstellung eines einzigen, lange Zeit benützbaren Serums jetzt immerhin noch dadurch eine ziemliche Genauigkeit erreichen, daß man eine kontinuierliche Reihe von Testseren gebraucht. Am besten geht man in der Weise vor, daß man das zu verwendende Testserum mit einigen Seren normaler Menschen auswertet. Es ist dies besonders für klinische Versuche nicht unwichtig. Seinen Hemmungswert nimmt man dann als Vergleichsgröße an; ein solches Serum, das klar geblieben ist, hält, im Frigo aufbewahrt, 2 bis 3 Wochen seinen Hemmungswert konstant. Zweckmäßig wird man aber schon nach etwa 8—10 Tagen das alte Testserum durch ein neues ersetzen; dieses wird vorher in einigen Versuchen an dem erst benützten geaicht. Nach weiteren ca. 8 Tagen wird wieder ein neues Kontrollserum an dem vorhergehenden ausgewertet und dann verwendet usw. Auf diese Weise ist es möglich, alle erhaltenen Versuchsergebnisse auf das erste Testserum bzw. die Werte normaler Menschenseren zu berechnen.

Die erzielten Ausschläge bei den Versuchen hängen nicht nur ab von der Hemmungskraft des betreffenden Serums, sondern auch von dem Verdauungswert des Versuches. Verdauungswert V ist gleich Endsäure minus Anfangssäure, d. h. Säuregehalt des Verdauungsgemisches ohne Antikörper mit und ohne Digestion cf. Kämmerer l. c.[3]). Es ist wohl einleuchtend, daß ein Serum niemals eine größere Hemmung aufweisen kann, als V beträgt, daß diese also immer nur — praktisch wenigstens —

gleich V oder kleiner als V sein kann. Die Hemmung steht somit in einem bestimmten Verhältnis zur Verdauung.

Die Trennung der Eiweißkörper im Serum erfolgte, wie schon eingangs erwähnt, mit der Methode Kämmerer-Mogulesco, auf deren technische Ausführung ich hier nicht näher eingehen kann. Sie ist am genannten Ort[2]) aufs Genaueste beschrieben. Bezüglich der Zeitdauer, die der ganze Vorgang des Ausfällens, Zentrifugierens und Waschens erfordert, verhalten sich die einzelnen Seren nicht ganz gleich. Einige Stunden sind zur Ausführung immer notwendig.

Mit den erhaltenen Fraktionen wurden für die Versuche Lösungen in phyhiologischer NaCl hergestellt, die einer 2prozentigen Serumlösung entsprechen, also vom Albuminanteil 0,4 auf 10,0, vom Globulin die erhaltenen 2 ccm auf 50,0. Die Lösungen waren völlig klar.

Auf den ersten Blick scheinen ja der sehr einfachen Methode einige Fehler anzuhaften. Bei genauer Ueberlegung und Untersuchung ergeben sich diese aber als ganz unwesentlich und vermeidbar. Zunächst hat das Arbeiten mit kleinen Mengen immer hinsichtlich der Genauigkeit seine Bedenken. In diesem Falle können jedoch die Fehler durch Exaktheit bei der Ausführung auf ein Minimum reduziert werden. So geringe Schwankungen sind aber dann für die Versuche völlig bedeutungslos, da doch nur mit verhältnismäßig großen Ausschlägen gerechnet wird. Ein weiterer Punkt — K. und M. haben dies schon erwähnt — liegt darin, daß das Ammoniumsulfat nicht mehr aus den Fraktionen entfernt wird. Aber einerseits hat in der schließlich gebrauchten, hochgradigen Verdünnung das Salz so gut wie keinen Einfluß auf die Verdauung (cf. auch den Versuch von Kämmerer u. Mog. l. c.[2]) (Seite 21), andererseits kann man sich, wie dort bemerkt, durch die oben erörterte Herstellung der Salzkonzentration gleiche Versuchsbedingungen schaffen.

Die vorhergehenden Bemerkungen dürften genügen, um auf die wichtigsten Anlässe zu Fehlern und Schwankungen bei den Versuchen hinzuweisen und um zu zeigen, wie dieselben etwa zu vermeiden sind.

Würden wir nun das Schema eines einfachen Versuches z. B. mit aktivem und inaktiviertem Serum und den Fraktionen, sowie den notwendigen Kontrollen skizzieren, wie er bei den vorliegenden Untersuchungen auch tatsächlich wiederholt ausgeführt wurde, so würde sich derselbe ungefähr folgendermaßen gestalten:

	Kölbchen	physiol. NaCl.	Ferment	Antikörper etc.	Casein (Nutrose)
Kontrollen:	I.	20 x	8	8 NaCl phys.	20
	II.	20 x	8	8 NaCl phys.	20
	III.	20 x	8	8 Testserum.	20
aktiv:	IV.	20 x	8	8 Serum	20
	V.	20	8	8 Albumin	20
	VI.	20	8	8 Globulin	20
inaktiviert:	VII.	20 x	8	8 Serum	20
	VIII.	20	8	8 Albumin	20
	IX.	24	8	8 Globulin	20

x) In den mit x bezeichneten Kölbchen davon 8 ccm durch die Salzlösung ($^1/_2$ gesätt. Ammoniumsulfatlösung in physiol. NaCl 4 auf 100) gesetzt.

Nach der Digestion — im Kölbchen I sogleich nach dem Einfüllen — kommt in jedes Kölbchen zur Ausfällung 20 ccm gesättigte Natriumsulfatlösung und 10 ccm $^1/_5$ Normal-Salzsäure. Es wird mit $^1/_{10}$ Normal-Natronlauge titriert und dabei bedeutet im folgenden 1 gleich $^1/_{10}$ ccm $^1/_{10}$ Normal NaOH (cf. die zitierten Arbeiten).

Selbstverständlich sind die von dem Ferment und den Antikörperlösungen zuzusetzenden Mengen durch Vorversuche festzustellen, können aber dann bei konstanten Fermenten lange Zeit hindurch beibehalten werden. In meinen Versuchen wurden, wie oben erwähnt, 2 promilliges Trypsin und 2 prozentige Antikörperlösungen verwendet.

Untersuchungsergebnisse.

Nach diesen methodischen Erörterungen muß jetzt auf das Verhalten der Fraktionen des Serums gegen Trypsin näher eingegangen werden. Ein Teil der Untersuchungsergebnisse wurde bereits veröffentlicht in der Arbeit: H. Kämmerer und L. Aubry: Untersuchungen über die Beziehungen der Serumeiweißkörper zur Antitrypsinwirkung. Biochemische Zeitschrift 48. Bd., 3. Heft.

Von den früheren Untersuchern legten u. a. Landsteiner[5]) und weiterhin Hedin[6]) fest, daß die antifermentative Wirkung des Serums an das Albumin gebunden sei. Mohr[7]) wiederum macht das Euglobulin dafür verantwortlich. Infolge der

5) „Zur Kenntnis der antifermentat. lytischen und agglutinierenden Wirkg. des Blutserums und der Lymphe.“ Zentralbl. f. Bakteriol. Bd. 27. 1900.

6) „Ueber verschiedenartige Hemmung der tryph. Verdauung“. Zeitschr. für physiol. Chemie. Bd. 52, 1907.

Ders. „Ueber die Aufnahme von Trypsin durch verschiedene Substanzen.“ Zeitschr. f. phys. Chemie. Bd. 50.

7) „Ueber Untersuchungen des mütterlichen und kindlichen Serums in seiner antikyphischen Wirkung.“ Dissert. Würzburg 1897.

Unmöglichkeit, mit den früheren Methoden exakt zahlenmäßige Verhältnisse zu erzielen, war eine genaue Feststellung der Hemmung der Fraktionen nicht möglich. Kämmerer und Mogulesco sind in ihrer Arbeit schon mit einer Reihe von Versuchen an die Frage der Beteiligung der Serumeiweißkörper herangetreten und zu folgenden Resultaten gekommen:

Es läßt sich bei den Fraktionen ein Unterschied feststellen gegenüber den einzelnen Fermenten, während für Pankreas- und Hefe-Trypsin der Albuminanteil bei der Hemmung vorwiegt, tritt derselbe bei Bakterienferment gegenüber dem Globulin zurück. Es ist einleuchtend, daß sich diese Tatsache nicht nur auf Verschiedenheit der Fermente gründen kann, sondern auch im Wesen der betreffenden Eiweißfraktion ihre Ursache haben muß. Es wäre ja nicht einzusehen, warum gerade die Hemmungskörper gegen das eine Ferment an der die für das andere an jener Fraktion haften sollten. Ganz kurz ist nun in der genannten Arbeit auch die Inaktivierbarkeit der Antifermente in den Fraktionen behandelt mit etwa folgendem Resultat:

Die Komponenten der Hemmungswirkung des Serums gehen wie das Vollserum nach einer einstündigen Erwärmung bei 56° in ihrem Werte zurück und zwar gegen Pankreas- und Hefetrypsin in ganz gleichmässiger Weise, sodaß die Summe der Werte der Fraktionen jeweils wieder ungefähr den Wert des Vollserums ergibt. Gegen Bakterienferment (Pyocyaneus) zeigt sich dagegen hochgradiger Rückgang der Fraktionen, sodaß der Hemmungswert jetzt weiter unter den des Vollserums sinkt. Es mögen kurz einige Zahlen aus dem dortigen Versuche von K. und M. an dieser Stelle zur Orientierung angeführt werden. Hiebei Inaktivierung der getrennten Fraktionen. Es fanden sich folgende Werte:

		Pankreas-Trypsin Verdauungswert 24	Pyocyaneusferment Verdauungswert 22
Aktiv:	Serum	Hemmung 8	Hemmung 12
	Albuminanteil	„ 5	„ 0.5
	Globulinanteil	„ 2.5	„ 9.5
Inaktiviert:	Serum	Hemmung 3	Hemmung 5
	Albuminanteil	„ 2.5	„ 0
	Globulinanteil	„ 0.5	„ 1

Wärmebehandlung.

Es galt nun, diese Tatsachen des Verhaltens beim Inaktivieren näher zu studieren.

Schon einer der ersten Versuche förderte eine auffallende Erscheinung zutage:

Versuch:

2‰ Trypsin. Serum eines Patienten mit sekundärer Schrumpfniere. Inaktivierung des Vollserums 30 Min. bei 56°.

Verdauungszeit 1 Stunde, 8 ccm 2 prozentige Serum- usw. Lösungen.

NaCl ohne Digestion		19,5	v =	30,0
NaCl mit Digestion		49,6		
Testserum Pferd		42,0	Hemmung	7,5
Serum	nicht	28,0	„	21,5
Albuminanteil	inakti-	36,5	„	13,0
Globulinanteil	viert.	41,0	„	8,5
Serum	inakti-	40,5	„	9,0
Albuminanteil	viert.	46,5	„	3,0
Globulinanteil		42,0	„	7,5

Die hohe Hemmungszahl des Serums 21,5 ist nicht besonders auffallend, da bei Nephritiden die Sera fast immer sehr stark hemmen, dagegen muß sofort das Zahlenverhältnis der Fraktionen bemerkenswert erscheinen. Jedesmal, sowohl aktiv, wie inaktiv, ergänzen sich die Werte ungefähr zu dem des Vollserums; während aber die Hemmung des Albumins von 13,0 auf 3,0, also um 10 zurückgeht, bleibt das Globulin relativ unverändert: 8,5 und 7,5. Dieser Befund steht vollkommen im Gegensatz zu dem oben erwähnten Versuchsresultat von K. u. M. Sollte die kurze Dauer der Inaktivierung etwa die Schuld tragen? Gegen diese Annahme spricht der deutliche Rückgang des Albumins. Es muß also vielleicht das Globulin eine größere Resistenz der Wärme gegenüber besitzen. Möglicherweise könnte auch eine Umwandlung von Albumin in Globulin in betracht kommen, ein Umstand, der an späterer Stelle noch näher erörtert werden soll.

Einige Versuche bei längerer Inaktivierung (eine Stunde bei 56 °) werden die Verhältnisse klarer erscheinen lassen.

Versuch:

Trypsin 2 ‰ ig 8,0; Serum einer Laryngitis tuberculosa Inaktivierung des Vollserums 1 Stunde. Digestion 1 Stunde 8,0 ccm 2 prozentige Lösung

v = 26.5.

			(C.)	x)
Pferdeserum		Hemmung (h) =	6.5	
Serum	akt.	„ =	13.0	
Albuminanteil		„ =	7.5	
Globulinanteil		„	3.0	
Serum	inakt.	„ =	3.0	
Albuminanteil		„ =	0.5	
Globulinanteil		„ =	1.5	

x) Falls nichts anderes bemerkt ist, wurden in allen Versuchen 8 ccm einer 2 ‰igen Trypsinlösung und 8 ccm der 2 prozentigen Antikörperlösung (Serum, Albumin, Globulin) verwendet. Die Digestionsdauer betrug dabei eine Stunde. C bedeutet Casein; N = Nutrose; v = Verdauungswert s. ob.; h = Hemmungswert.

oder ein analoges Beispiel:

Versuch:

Serum: Uraemie und Erysipel.

v = 21,7 (N.)

Pferdeserum		h =	7.8
Serum	akt.	h =	11.7
Albuminanteil	akt.	h =	6.0
Globulinanteil	akt.	h =	4.3
Serum	inakt.	h =	6.1
Albuminanteil	inakt.	h =	3.1
Globulinanteil	inakt.	h =	4.3

Während Serum und Albumin etwa um die Hälfte ihres Hemmungswertes durch die Inaktivierung zurückgehen, bleibt das Globulin unverändert. Ganz interessant waren die Verhältnisse auch bei einer zum Versuch verwendeten Ascitesflüssigkeit. Sie stammte von einem Patienten, der zwei Tage nach der Punktion an einem Medullarcarcinom des Magens mit Metastasen, ad exitum kam.

Der Versuch war vollkommen analog dem obigen ausgeführt und brachte folgendes Resultat:

v = 24.2 (N.)

Pferdeserum		h	9.0
Ascitesflüssigkeit	akt.	h =	16.0
Albuminanteil	akt.	h =	15.0
Globulinanteil	akt.	h =	2.3
Ascitesflüssigkeit	inakt.	h	4.1
Albuminanteil	inakt.	h	3.7
Globulinanteil	inakt.	h	2.2

Auffallend ist die hohe Hemmungszahl des Albumins, die aktiv wie inaktiviert dem Werte der unveränderten Ascitesflüssigkeit nahekommt. Bei Albumin und Globulin wieder der verschiedene Rückgang.

In der folgenden Tabelle findet sich noch eine Anzahl ähnlicher Ergebnisse.

№	v.	Ser.	Alb.	Glob.	Ser.	Alb.	Glob.	inakt.	Diagnose;
I	25,0	19,5	13,5	8,0	8,0	0,5	5,0	½ Std.	Chron. Nephritis
II	27,5	16,5	15,0	3,0	3,5	2,5	2,5	„ „	Carcin. Fall II (Asc. flüssigkt.
III	25,0	14,0	11,0	5,0	4,0	3,0	3,0	„ „	Myelitis transversalis acuta
IV	28,5	11,5	6,5	3,0	3,0	1,5	2,0	1 „	Plethora.
V	26,0	13,0	7,5	3,0	3,0	0,5	1,5	1 „	Ophthalmoplegie Dermatitis tbc.
VI	22,7	7,8	5,0	3,4	3,8	1,9	2,5	1 „	Hamiplegie Arterioskler.Lues.
VII	23,6	19,0	12,0	3,0	3,1	1,2	2,7	1 „	Uraemie
VIII	21,8	9,9	6,2	2,9	3,7	1,9	3,1	1 „	Myeloide Leucaemie.

Um diese Verhältnisse der Wärmeresistenz näher zu studieren, wurden die Eiweißkörper unter verschiedenen Bedingungen einer Temperatur von 56° ausgesetzt.

Bei der in den Versuchen angewendeten Methode der Ausfällung mußte man daran denken, daß die zugesetzte, stark konzentrierte Salzlösung möglicherweise einen gewissen Einfluß ausübt auf das Ergebnis der Wärmebehandlung. Man kann es nicht ohne weiteres als gleichgültig annehmen, ob das Serum noch in seinem natürlichen Zustand ist oder ob bereits die Ammoniumsulfatlösung demselben beigefügt wurde, wenn die Wärme einwirkt. Aus diesen Erwägungen ergab sich die Notwendigkeit, in verschiedenen Zuständen das Serum bzw. seine Fraktionen den Temperatureinflüssen auszusetzen.

1. In einer Anzahl von Versuchen wurde das native Serum völlig unbehandelt, also bevor es in seine Fraktionen getrennt worden war, erwärmt bei 56° 1/2 bis 1 ganze Stunde lang. Hier befinden sich die Fraktionen noch aller Wahrscheinlichkeit nach in dem natürlichen chemisch-physikalischen Zustande, wenn die erhöhte Temperatur ihre Wirkung ausübt. In dieser Weise wurde auch in den vorerwähnten eigenen Versuchen inaktiviert.

2. Ließ ich die Wärme einwirken, nachdem bereits die Trennung vollzogen war, indem ich die Fraktionen benützte, in dem Stadium, wo sie noch in halbgesättigtem Ammoniumsulfat gelöst waren, also Albumin gleich nach dem Zentrifugieren, Globulin nach dem Waschen und Auffüllen auf die ursprüngliche Menge von 2 ccm und nun inaktivierte, so konnte auf diese Weise die Wärmeresistenz der Fraktionen für sich studiert werden. Man muß dabei aber wohl in Betracht ziehen, daß möglicherweise auch die stark konzentrierte Salzlösung einen gewissen Einfluß auf das Ergebnis hat. Um nun event. diesen letztgenannten Faktor auszuschalten, wurde

3. so verfahren, daß bereits die für den Versuch selbst zu verwendenden 2prozentigen Lösungen hergestellt und nun diese inaktiviert wurden. Damit war natürlich auch das Salz stark verdünnt worden.

Versuch:

Serum einer Patientin mit Arteriosklerose und Lues (cf. Tabelle Nr. VI.), welche einen hemiplegischen Insult erlitten hat.

v = 21.6 (N.)

Pferdeserum		h	7.9
Serum	akt.	h	8.3
Albuminanteil	akt.	h	5.3
Globulinanteil	akt.	h	3.0
Serum	inakt.	h	4.6
Albuminanteil	inakt.	h	2.5
Globulinanteil	inakt.	h	1.8

Es wurden in diesem Falle die 2 prozentigen Verdünnungen zum Inaktivieren gebracht. Um auch im Serum entsprechende Verhältnisse zu bekommen, wurde dessen Verdünnung nicht einfach mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt, sondern mit einer Lösung von 4 ccm halbgesättigter Ammoniumsulfatlösung in 100 ccm physiologischer Na Cl. (Im Versuch selbst war dann natürlich die Salzkonzentration für dieses Kölbchen dadurch schon vorhanden und nicht mehr zu korrigieren.)

Die auf diese Weise erhaltenen Zahlenwerte entsprechen völlig denen, die K. u. M. erhielten, also gleichmäßiger Rückgang in allen Teilen.

Ganz charakteristisch ist das Ergebnis bei einem Versuch, in dem an demselben Serum beide Arten der Inaktivierung untersucht wurden. Leider konnte aus äußeren Gründen im gleichen Versuch das aktive Serum mit seinen Fraktionen nicht eingestellt werden, sondern nur das Serum allein. In einem Vorversuche hatten sich jedoch normale Verhältnisse der Fraktionen ergeben, nämlich bei einer Verdauung von 27,6 für Pferdeserum h = 8,1; Serum h = 19,8; Albuminanteil h = 11,0 Globulinanteil h = 6,8.

Es zeigten sich folgende Resultate:

Versuch:

Serum: Nephritis.

v = 23.1. (N.)

	Pferdeserum		h	7.5
	Serum aktiv		h	16.7
A.	Serum	inakt.	h	5.7
	Albuminanteil		h	0
	Globulinanteil		h	4.5
B.	Serum	inakt.	h	3.7
	Albuminanteil		h =	1.6
	Globulinanteil		h =	2.0

Die Partie A. wurde inaktiviert, bevor die Ausfällung vollzogen war; B. nach der Trennung und zwar in 2 prozentigen Verdünnungen (1 Stunde 56°).

Die Verhältnisse sind freilich nicht so prägnant, wie im vorigen Versuch, aber immerhin deutlich. Die Werte für das aktive Serum kann man anschließend an den Befund 16,7 schätzungsweise vielleicht zu ca. 9 bei Albumin und ca. 5 bei Globulin annehmen. Es ergibt sich bei A ein hochgradiger Rückgang bis zur Unmeßbarkeit für Albumin und fast keiner oder jedenfalls nur ein geringer für Globulin. Bei B erscheint für Albumin ein dem Serumwert von 3,7 etwa entsprechender Wert, während der für Globulin verhältnismäßig zu hoch ist, im Vergleich zu A, aber immerhin einen bedeutenden Rückgang zeigt. Die Hemmung durch das Serum ist bei B geringer als bei A.

Es zeigt sich also auch hier wieder im allgemeinen einerseits der stärkere Rückgang der Albuminhemmung gegenüber dem sehr geringen bei Globulin, dann, wenn das Serum in toto inaktiviert wird; andererseits ein, wenigstens ungefähr den Verhältnissen im aktiven Serum entsprechender, gleichmäßiger Rückgang bei Inaktivierung nach der Trennung und Verdünnung.

Was findet sich nun, wenn wir inaktivieren in dem Stadium, wo nach erfolgter Trennung der Fraktionen die Salze noch in hoher Konzentration vorhanden sind?

Versuch:

Serum: Nephritis.

v = 27.6 (N)

Pferdeserum		h = 8.1
Serum	akt.	h = 19.8
Albuminanteil	akt.	h = 11.0
Globulinanteil	akt.	h = 6.8
Serum	inakt.	h = 9.2
Albuminanteil	inakt.	h = 9.5
Globulinanteil	inakt.	h = 7.7

oder

Versuch:

Serum: Laryngitis und Dermatitis tuberculosa v = 25,5.

v = 25,5. (N)

Pferdeserum		h = 6,0
Serum	akt.	h = 12,2
Albuminanteil	akt.	h = 6,7
Globulinanteil	akt.	h = 2,6
Serum	inakt.	h = 2,0
Albuminanteil	inakt.	h = 7,7
Globulinanteil	inakt.	h = 4,2

Der Rückgang des Serums ist in beiden Fällen stark; es kann das inaktivierte Vollserum mit den Fraktionen hier natürlich nicht ohne weiteres verglichen werden, da in ihm während der Wärmeeinwirkung das Ammoniumsulfat fehlte. Die Fraktionen ergeben in beiden Versuchen einen auffallend geringen Rückgang. Ob die Zunahme bei Albumin im 1. und bei Globulin im 2. Falle eine nur zufällige, durch Fehlerquellen hervorgerufene Erscheinung ist, oder ob sie auf anderen, unbekannten Ursachen beruht, müssen weitere Untersuchungen lehren. Im übrigen scheint der Versuch darauf hinzuweisen, daß das Salz einen gewissen Schutz gegen den Einfluß der Wärme bietet.

Wissenswert wäre, ob auch ein Einfluß vom Salz auf das Gesamtserum ausgeübt wird. Um dies festzustellen, wurde in einem Versuche, der entsprechend dem obigen ausgeführt wurde, noch das Serum eingestellt unter Zusatz der Salzlösung, d. h. es wurde wie bei der üblichen Ausfällung verfahren, aber nicht zentrifugiert, sondern inaktiviert und schließlich die 2 prozentige

Lösung hergestellt. Der Globulinniederschlag löste sich glatt, der Versuch ergab:

Versuch:

Serum: Periostitis luetica.

v 17.6 (C)

Pferdeserum		h = 3.7
Serum	akt.	h = 9.0
Albuminanteil	akt.	h = 6.4
Globulinanteil	akt.	h = 1.4
Serum 1	inakt.	h = 0.8
Serum 2	inakt.	h = 8.8
Albuminanteil	inakt.	h = 5.3
Globulinanteil	inakt.	h = 1.1

c Die geringe Verdauung entstand durch hohe Anfangssäure, die in der sauer reagierenden Casein-Lösung ihren Grund hatte. (cf. früher.) Deshalb sind auch alle Hemmungswerte auffallend niedrig.

Wurde also das Serum Serum 1 nativ, d. i. vor der Ausfällung, der Wärmeeinwirkung ausgesetzt, so ergab sich, wie in allen ähnlichen Versuchen, eine starke Verminderung der Hemmung. Wenn man dagegen, wie in der mit Serum 2 bezeichneten Probe, dem Serum die gleiche Menge gesättigter Ammoniumsulfatlösung zusetzte, wobei natürlich die Globuline ausfielen, und dann die Wärme einwirken ließ, so konnte man kaum einen merklichen Rückgang erkennen (von 9,0 auf 8,8). Die Zahlen der Fraktionen sind ohne weiteres klar.

Diese letzteren Versuche lassen erkennen, daß bei Gegenwart der konzentrierten Salzlösung die Hemmungskraft des Serums bedeutend weniger durch Wärme angegriffen wird. Aehnliche Verhältnisse hat Buchner[8]) 1893 bei Alexinen, Enzymen und Toxalbuminen festgestellt, nämlich, daß Salze, besonders Sulfate u. a. die Resistenz des Serumalexins gegen Wärmeeinwirkung erhöhen. Buchner führt diese Wirkung auf die Wasserentziehung durch die Salze zurück, indem diese einen sonst bei der Inaktivierung auftretenden Quellungszustand der Moleküle verhinderten. Auch Friedbergers[9]) Versuche am Meerschweinchenkomplement führten zu ähnlichen Ergebnissen.

Rückblick:

1. Setzt man das native Serum $^1/_2$ bis 1 Stunde der Einwirkung einer Temperatur von 56° aus, so geht es in seinem Hemmungswerte stark zurück. Durch Zufügen von Ammoniumsulfatlösung bis zur Halbsättigung wird dieser Rückgang zum Teil verhindert.

2. Wird das Vollserum inaktiviert und die Trennung nachträglich vollzogen, so zeigt das Albumin prozentual stärkeren, das Globulin geringeren Hemmungsrückgang.

[8]) Archiv für Hygiene, Bd. 17.
[9]) Zentralblatt für Bakteriol., Bd. 46.

3. Erwärmt man die Fraktionen einzeln bei 56° solange sie noch die konzentrierte, halbgesättigte Salzlösung enthalten, d. h. bevor man die 2prozentigen Verdünnungen herstellt, so zeigt sich, daß die Fraktionen prozentual nur wenig in ihrem Hemmungswerte zurückgehen.

4. Nimmt man die Wärmeinaktivierung vor, nachdem man die einzelnen Komponenten stark verdünnt hat (2prozentige Lösungen), so ergibt sich ein deutlicher, ziemlich gleichmäßiger Rückgang des Serums und der Fraktionen.

Wie ließen sich diese Verhältnisse etwa erklären?

Daß das Serum nach dem Inaktivieren weniger hemmt, ist nicht sonderlich auffallend und allem Anschein nach auf ein Unwirksamwerden oder eine Zerstörung der Hemmungsstoffe zurückzuführen. Wenn die einzelnen Seren sich in ihrer Inaktivierbarkeit ganz verschieden verhalten — bereits Kämmerer hat dies betont — so müssen dafür wohl gewisse individuelle Eigentümlichkeiten der einzelnen Seren maßgebend sein, deren Natur bis jetzt noch völlig unbekannt ist und für die auch noch keine bestimmten Anhaltspunkte zu gewinnen waren. Möglicherweise bedingen bestimmte Erkrankungen eine größere Labilität der Hemmungskörper. Nur eine große Anzahl klinischer Versuchsreihen wird darüber vielleicht einige Klarheit schaffen können. Sowohl bei aktiv stark hemmenden Seren, wie bei schwach hemmenden, konnte in meinen Versuchen bald ein prozentual starker, bald ein geringer Rückgang unter dem Wärmeeinfluß beobachtet werden.

Besonders in Erscheinung trat in den vorausgehenden Versuchen der verschiedene Rückgang bei Albumin und Globulin nach Inaktivierung des Vollserums. Wie oben schon kurz erwähnt, gewinnt man dabei den Eindruck, als sei die Albuminfraktion weniger resistent gegen thermische Einflüsse wie die Globuline. Man kann jedoch noch keineswegs sichere Anhaltspunkte gewinnen, die dieses verschiedene Verhalten der beiden Fraktionen erklären. Ob nun diese Eigenschaft des Albumins darauf beruht, daß vielleicht infolge einer bestimmten molekularen Konstitution dieser Eiweißkörper weniger imstande ist, die Hemmungskörper festzuhalten, oder ob die Antikörper des Albumins, wenn sie etwa mit denen des Globulins nicht völlig identisch sein sollten, eine geringere Anheftungsfähigkeit haben oder ob irgend andere Verhältnisse vorliegen, das zu entscheiden ist gegenwärtig nicht möglich. Unter Umständen könnten auch die beiden Eiweißkörper durch die Wärmeeinwirkung in gewisse Beziehungen zu einander treten, sodaß event. die Ursache in chemischen Umwertungen zu suchen wäre, die während des Inaktivierens eintreten. Für diese Frage käme besonders in Betracht die Umwandlung von Albumin in Globulin, wie sie L.

Moll[10]) in seiner Arbeit „Ueber künstliche Umwandlung von Albumin in Globulin“ nachgewiesen hat.

Er kommt zu folgenden Befunden:

Nach einhalbstündigem Erwärmen auf 56° zeigte sich im Serum deutliche Zunahme der Globulinfraktion ohne Albuminatbildung. Die künstlichen Globuline zeigen sich in Schwefelgehalt, Koagulationstemperatur und biologischem Verhalten völlig mit natürlichen Globulinen übereinstimmend. Die Umwandlung, die auf einer Funktion der Hydroxylionen beruhe, wird gehemmt durch Neutralsalze, besonders Ammonsalze, und zwar ist die Hemmung bei konzentrierten Eiweißlösungen stärker als bei verdünnten.

Ein eigener Versuch ergab auch Resultate, die wohl mit den Befunden von Moll in Einklang stehen. Dabei handelte es sich um die Feststellung der quantitativen Verhältnisse der Eiweißkörper vor und nach dem Inaktivieren. Es erschien für diesen Zweck genügend, den Wert des Gesamteiweißes und des Globulins zu bestimmen und zwar frisch und nach einstündigem Inaktivieren.

Die Ausführung geschah folgendermaßen:*)

Es wurden je 3 ccm Serum verwendet. Das Gesamteiweiß wurde gewonnen, indem das Serum in ca. 50 ccm kochendes Wasser eingebracht wurde, dem man tropfenweise so viel verdünnte Essigsäure zusetzte, bis das Eiweiß flokkig ausgefallen war, die Flüssigkeit aber sich völlig klar und eiweißfrei erwies. Filtration; Trocknung bei 110°, Auswaschen mit heißem Wasser, Alkohol und Aether.

Das Globulin wurde erhalten durch Ausfällen mit der gleichen Menge gesättigter Ammoniumsulfatlösung. Nach einstündigem Stuhen wurde filtriert und mit Ammoniumsulfatlösung ausgewaschen. Trocknung bei 110°; gründliches Waschen mit heißem Wasser - wegen Verwendung der Kjeldahl'schen N-Bestimmung muß der Niederschlag und das Filter völlig von Ammoniumsulfat befreit werden — Auswaschen mit Alkohol und Aether.

Mit Kjeldahl ergab sich

Clobulin aktiv	3,6604%
Globulin inaktiviert	4,0977%.

Die Annahme einer Verwandlung von Albumin in Globulin in der Wärme, wie sie sich aus den Untersuchungen von Moll ergibt, scheint mit unseren Ergebnissen gut in Einklang zu stehen, und zwar einerseits die Umwandlung als solche und dann besonders die Hemmung derselben durch Neutralsalze.

Es wäre etwa folgendermaßen zu denken:

Albumin und Globulin büßen beide durch die Wärme einen Teil ihrer Hemmungskraft ein. Dazu kommt beim Albumin noch

[10]) Hofmeisters Beiträge. IV. 12.

*) Im Wesentlichen entnommen: Felix Hoppe-Seylers Handbuch der physiologisch- und pathologischen-chemischen Analyse. Bearbeitet von H. Tierfelder, Berlin 1909.

ein Teil, der durch die Umwandlung für die Hemmung verloren geht, während beim Globulin dadurch ein Ausgleich des durch die Wärme eingetretenen Rückganges zustande käme, daß eben durch die Umwandlung auch Hemmungskörper vom Albumin übertreten. Wenn diese letzteren auch abgeschwächt sind, so könnten sie dennoch bei den an sich niederen Werten des Globulins wieder eine Hemmung erzielen, die derjenigen im aktiven Zustand nahekommt. Weiterhin bei Zusatz von Ammoniumsulfat: Man kann hier nur den Teil des Rückganges wahrnehmen, der der Wärme allein zuzuschreiben ist. Da das Salz hemmend auf die Umwandlung wirkt, zumal dann, wenn es in höherer Konzentration mit Eiweiß vorhanden ist, so bleibt auch der Albuminwert verhältnismäßig hoch. Vielleicht kommt für beide Fraktionen überdies noch ein gewisser Schutz durch das konzentrierte Salz selbst gegenüber der Wärme in Betracht. Endlich bei Verdünnung tritt wieder der direkte Einfluß der Wärme zutage und dann beim Albumin ein geringfügiger, aber doch etwas größerer Teil als bei der konzentrierten Lösung, der wieder durch Umwandlung verloren geht. Für das Globulin käme hiebei einerseits der Rückgang durch Wärme, andererseits nur ein geringerer Ersatz durch Umwandlung in Betracht. Wir würden also auf diese Weise bei beiden Fraktionen den gleichmäßigen, aber immerhin merklichen Rückgang erhalten.

Derartige Ueberlegungen wären mit den Versuchsergebnissen gut übereinstimmend, und man könnte sich so die Befunde zu erklären versuchen. Aber ein Beweis für das tatsächliche Vorhandensein derartiger Verhältnisse ist durchaus noch nicht gegeben.

Die Hemmungswirkung der Eiweisfraktion beim Verdauungsversuch scheint nicht parallel zu gehen mit den tatsächlichen quantitativen Verhältnissen im Serum. Auffallend ist wenigstens die Tatsache, daß sich Hemmung und quantitative Verhältnisse gerade umgekehrt verhalten können, indem zum Beispiel im einen Fall der Menge nach das Globulin bedeutend über das Albumin überwiegt, in einem anderen das Albumin über das Globulin und daß sich trotzdem bei der Trypsinhemmung relativ gleiche Verhältnisse finden. Als Beispiel kann ein Vergleich zwischen Menschen- und Pferdeserum dienen:

Nach Lewinski verhält sich Globulin zum Albumin beim

Menschen . . . . . = 1:1,51
Pferd . . . . . = 1:0,58,

also etwa wie 2:3 bzw. 2:1.

Im Verdauungsversuch bekommen wir folgende Verhältnisse:

Versuch:

Inaktivierung vor der Trennung $^1/_2$ St. bei 56°.
Pferdeserum.

v = 28.5 (C.)

Serum	akt.	h	6.5
Albuminanteil	akt.	h	4.5
Globulinanteil	akt.	h	2.0
Serum	inakt.	h	4.5
Albuminanteil	inakt.	h	1.5
Globulinanteil	inakt.	h	3.0

Obwohl also beim Pferd die Globulinmenge eine doppelt so große ist, als die des Albumins, ist doch die Albuminhemmung bedeutender, worauf der höhere Globulinwert nach dem Inaktivieren beruht, ist, wie bereits an früherer Stelle erwähnt, nicht sicher gestellt. Sollte etwa doch auch dabei die Umwandlung in Betracht kommen? Die mehrfach erörterte Umkehrung zwischen Albumin- und Globulinwert ist auch in diesem Versuch klar.

Aetherbehandlung.

Um vielleicht näheres zu erfahren über die Beeinflußbarkeit der Hemmungskörper im Serum wurde auch der Versuch gemacht, durch ein chemisches Agens auf dieselben einzuwirken; es erwies sich dafür Aether insoferne als besonders günstig, als er leicht wieder vollkommen entfernt werden kann.

Versuch:

Serum: Plethora.

v = 23.5 (C.)

Pferdeserum		h	8.5
Serum	nicht behandelt	h	12.0
Albuminanteil	nicht behandelt	h	8.0
Globulinanteil	nicht behandelt	h	4.5
Serum	mit Aether behandelt	h	3.5
Albuminanteil	mit Aether behandelt	h	2.5
Globulinanteil	mit Aether behandelt	h	3.0

Technik: Die Behandlung mit Aether geschah in diesem Versuch folgendermaßen:

Das Serum wurde nativ in einer dunklen Flasche mit der doppelten Menge Aether versetzt und 45 Minuten im Schüttelapparat durchgeschüttelt; hierauf in einem Scheidetrichter getrennt, das Serum in einer flachen Schale ca. 25 Minuten bei 37° gehalten, um den etwa noch vorhandenen Aether zu verdunsten und schließlich in der üblichen Weise die Trennung ausgeführt.

Auch in diesem Falle tritt die Erscheinung zutage, die schon bei Wärmeeinwirkung auf die Seren festgestellt werden konnte, nämlich der verhältnismäßig starke Rückgang bei Albumin und die geringe Beeinträchtigung des Globulinwertes.

Eine halbstündige Erwärmung des nativen Serums ergab im gleichen Versuch die Werte:

Serum	h = 8,5
Albuminanteil	„ = 6,0
Globulinanteil	„ = 4,5.

Bei Aethereinwirkung ist eine Ueberführung von Albumin in Globulin, wie sie nach Moll bei der Wärmebehandlung vorkommt, kaum wahrscheinlich und man wird daher eher an eine direkte Zerstörung der Antikörper denken müssen und zwar in der Art, daß dabei die an Albumin gebundenen Antikörper weniger resistent sind, als die des Globulins. Es sprechen also die Befunde bei der Aetherbehandlung eher gegen eine Beeinflussung der Hemmungswerte durch chemische Umwandlung der Eiweißkörper, wie sie an früherer Stelle erwogen wurde.

Ein weiterer Versuch gab ähnliche Verhältnisse:

Versuch:

Serum: Nephritis.

v = 25.5 (N.)

Pferdeserum		h = 9.0
Serum nicht behandelt		h = 17.7
Serum	mit Aether behandelt	h = 9.2
Albuminanteil		h = 2.8
Globulinanteil		h = 6.0

Bei einem einige Tage vorher angestellten Versuche hatten sich im aktiven Serum folgende Verhältnisse ergeben:

v = 27.6 (N.)

Pferdeserum	h = 8.1
Serum	h = 19.8
Albuminanteil	h = 11.0
Globulinanteil	h = 6.8

Es können demnach entsprechende Werte als Grundlage für den Aetherversuch angenommen werden. Unter dieser Voraussetzung finden sich auch hier für die Albuminfraktion verhältnismäßig viel größere Differenzen zwischen dem mit Aether behandelten und dem nicht behandelten Serum als für Globulin. Im ersten Versuche verhielten sich der Wert der Hemmung des aktiven zu dem des mit Aether geschüttelten Teiles beim Albumin etwa wie 3:1, beim Globulin wie 3:2; im zweiten Versuche würde sich etwa ein Verhältnis von 3:1, bzw. wohl 3:3 ergeben, also kaum eine nennenswerte Veränderung für Globulin.

Entsprechend den bezüglich der Wärmeresistenz angestellten Versuchen tritt jetzt noch die Forderung auf, die einzelnen Fraktionen auch getrennt der Aethereinwirkung zu unterziehen. Dafür ergeben sich aber ziemlich bedeutende, nur zu einem geringen Teil überwindbare technische Schwierigkeiten. Während man dort die Fraktionen — sei es nun konzentriert, oder in Verdünnung — in Gefäßen von gleicher Qualität gleichzeitig in das Wasserbad einstellen und wieder entnehmen kann, ist die ganz gleichmäßige Behandlung hier schwierig. Mit Hilfe einer Schüttelmaschine und dadurch, daß zu gleichen Mengen der Eiweißlösungen auch unter sich gleiche Mengen Aether ge-

bracht werden und daß man möglichst gleiche Gefäße — Schüsseltrichter oder Flaschen mit Glasstopfen — verwendet, können ja annähernd gleiche Bedingungen geschaffen werden.

Von einer Behandlung der konzentrierten Lösungen wurde wegen der zu erwartenden großen Ungenauigkeiten völlig abgesehen; auch mit 2prozentiger Verdünnung wurde nicht gearbeitet. Dagegen schien eine Untersuchung mit einer mäßig konzentrierten Lösung wenigstens eines Versuches wert zu sein und noch die relativ größte Genauigkeit zu garantieren. Die Technik war folgende:

Nach der üblichen Trennung wurde je eine 10prozentige Lösung hergestellt und dann je 20 ccm davon mit je der doppelten Menge Aether geschüttelt (in einem Falle 10 Minuten, im anderen 4 Minuten lang). Nach dem Absetzen der Serumlösung wurde 15 Minuten bei 37° verdunstet in flachen Schalen. Nachträglich wurden die 2prozentigen Lösungen für den Versuch hergestellt.

Trotz der kurzen Einwirkung sind die erhaltenen Zahlenwerte so niedrige, daß sie kaum eine Beurteilung zulassen. Sie liegen innerhalb der Fehlerbreite. Auch durch Einstellen der doppelten Serum- usw. Menge ließen sich keine klaren Ergebnisse erzielen. Sicher ist nur der außerordentliche Rückgang aller Komponenten. Wenn wirklich die Zahlen Schlüsse zulassen sollten, so scheinen die Verhältnisse ähnlich denen bei Verdünnung und Wärmeanwendung zu sein, nämlich etwa gleichmäßiger Rückgang der Fraktionen, entsprechend dem nicht behandelten Serum.

Im Versuch wurde das schon untersuchte Serum der Plethora gebraucht, das freilich bereits etwas in seiner Hemmung zurückgegangen war. Ich erhielt folgende 2 Reihen:

Versuch:

			(10 Min. behandelt) v = 27.5	(C.) (4 Min. behandelt) v = 23.0
Serum nicht behandelt			h = 9.5	h = 9.0
mit Aether behandelt	Serum	je 8 cm	h = 1.0	h = 1.0
	Albuminanteil		h = 0	h = 0.5
	Globulinanteil		h = 0.5	h = 0
	Serum	je 16 cm	h = 4.5	h = 4.0
	Albuminanteil		h = 1.5	h = 0.5
	Globulinanteil		h = 1.0	h = 0

Aufbewahrung.

weiter wurde noch versucht, die Einwirkung einer längeren Aufbewahrung in Verdünnung auf Serum, Albumin und Globulin festzustellen.

Es war zu diesem Zwecke notwendig, die ganze Versuchsreihe doppelt einzustellen: einmal mit den frisch bereiteten Verdünnungen und dann mit denen, die aufbewahrt worden waren.

Weiter wurde zur Kontrolle im 2. Versuch wenigstens noch das Serum, das nativ im Frigo aufbewahrt worden war, in frisch hergestellter Verdünnung untersucht. Die Aufbewahrung geschah jedesmal in 2 prozentiger Verdünnung und zwar so, daß je 20 ccm derselben in luftdicht verschlossenen Kölbchen mit einigen Tropfen Toluol versetzt wurden. Aufbewahrung bei Serie I 17 Stunden im Eisschrank; bei Serie II 2 mal bzw. 5 mal 24 Stunden dunkel, bei Zimmertemperatur.

Serie I.

Serum: Plethora.

a) frisch: v = 25.5		b) aufbewahrt v = 26.5	
Serum	h = 9.0	Serum	h = 10.0
Albuminanteil	h = 5.5	Albuminanteil	h = 6.5
Globulinanteil	h = 1.5	Globulinanteil	h = 1.5
		Kontrolle des frischen Serums	h = 9.5

Serie II.

Pferdeserum.

a) frisch v = 26.0		b) aufbewahrt (2 Tage) v = 23.0		c) aufbewahrt (5 Tage) v = 26.0	
Serum	h = 7.0	Serum	h = 8.5	Serum	h = 8.5
Albuminanteil	h = 4.5	Albuminanteil	h = 5.0	Albuminanteil	h = 5.0
Globulinanteil	h = 2.5	Globulinanteil	h = 3.5	Globulinanteil	h = 3.0
		Kontrolle des frischen Serums	h = 8.0	Kontrolle des frischen Serums	h = 8.5

Es zeigen also in beiden Serien die Fraktionen eine große Widerstandsfähigkeit selbst gegen lange Aufbewahrung. Ob den etwas höheren Werten im aufbewahrten Serum eine Bedeutung beizumessen ist, entzieht sich meiner Beurteilung. Eigentlich kann man sich ja nicht vorstellen, wodurch die Werte höher werden sollten. Von einer Eindickung infolge von Verdunstung kann kaum die Rede sein.

Es war nun der Gedanke naheliegend, daß durch eine kurze, der Aufbewahrung vorhergehende Wärmeeinwirkung die Resistenz herabgesetzt werden könnte, indem dadurch vielleicht eine gewisse Lockerung der Hemmungskörper eintrete, die sie weniger widerstandsfähig gegen andere Einflüsse mache. Zu diesem Zwecke wurde der Aufbewahrung, die in der oben angeführten Weise geschah, eine Wärmeinaktivierung von 15 Minuten bei 56° vorausgeschickt. Die Kontrolle wurde in der gleichen Art inaktiviert, freilich nicht zu gleicher Zeit, sondern erst kurz vor dem Versuche, wodurch event. kleine Differenzen entstehen konnten.

Versuch:

Serum: Nephritis.

v = 23.9 (N.)

Pferdeserum		h = 9.6
Serum aktiv		h = 17.6
Serum		h = 13.9
Albuminanteil	inaktiv und frisch	h = 7.0
Globulinanteil		h = 8.0
Serum	inaktiv und aufbe-	h = 14.2
Albuminanteil	wahrt bei Zimmer-	h = 7.6
Globulinanteil	temperatur 22 Stund.	h = 8.2

Auch hier zeigen sich keine bedeutenden Unterschiede; jedenfalls ist keine beträchtlichere Resistenzverminderung festzustellen. Bezüglich der Erhöhung nach der Aufbewahrung gilt das oben Gesagte.

Essigsäure-Einwirkung.

In seiner Arbeit „Ueber verschiedenartige Hemmung der tryptischen Verdauung" hat Hedin für Rinderserum-Albumin nachgewiesen, daß für geringe Mengen des während 20 Stunden bei 37° mit 0,2 Prozent Essigsäure behandelten Albumins eine Hemmung kaum mehr festzustellen sei, während größere Mengen noch deutlich hemmten. Seine Technik war eine wesentlich andere als die hier verfolgte: Verdauung durch Pankreas-Autolysat mit Casein 2,5 prozentig in Na_2CO_3-Lösung während 1—2 Tagen, Ausfällung mit Gerbstoff und Stickstoffbestimmung.

Mit der in der vorliegenden Arbeit geübten Methode ergab ein entsprechender Versuch folgendes Resultat:

Versuch:

Serum: Nephritis.

v = 25 5 (N.)

(14 Stunden behandelt.)

Pferdeserum		h = 8.0
Serum frisch		h = 19.3
Serum	nach	h = 15.7
Albuminanteil	Essigsäure-	h = 7.4
Globulinanteil	behandlung	h = 6.4
Serum		h = 17.3
Albuminanteil	Kontrolle	h = 8.9
Globulinanteil	mit NaCl	h = 6.9

Versuch:

Pferdeserum.

v = 28.8 (C.)

(20 Stunden behandelt.)

Serum frisch		h = 6.8
Serum	nach	h = 6.9
Albuminanteil	Essigsäure-	h = 3.3
Globulinanteil	behandlung	h = 1.5
Serum		h = 7.3
Albuminanteil	Kontrolle	h = 3.2
Globulinanteil	mit NaCl	h = 1.6

Technik: Die Behandlung geschah in der Weise, daß vom Serum 19 ccm mit 1 ccm 4 prozentiger Essigsäure versetzt wurden, dadurch entstand eine 0.2 prozentige Essigsäure-Lösung im Serum, und daß zur Kontrolle dem Serum 1 ccm physiologische NaCl-Lösung beigefügt wurde. Dann kamen beide Lösungen für 14 bezw. 20 Stunden in den Brutofen bei 37°. Mit diesen Serumstammlösungen wurde dann die Ausfällung vorgenommen und die 2 prozentigen Verdünnungen hergestellt. Um völlig übereinstimmende Verhältnisse zu bekommen, wurde auch in den mit „Serum frisch" bezeichneten Kontrollen vorher noch 5 prozent physiologische Kochsalzlösung zugesetzt, sodaß damit in allen Teilen der Versuch statt mit dem konzentrierten, mit einem etwas flüssigkeitsreicheren Serum (es war nach obigem 95 Prozent des Normalen) gearbeitet wurde.

Bezüglich des Resultates zeigt sich in dem ersten Versuch wohl ein etwas größerer Rückgang der Hemmung als in der Kontrolle, doch scheint, wenigstens wenn wir die Zahlen des Serums allein vergleichen (19,3 gegen 17,3) vielleicht auch ein Teil des Rückganges rein auf Kosten der höheren Temperatur im Brutschrank zu setzen zu sein. Bei dem zweiten Versuch mit Pferdeserum, in dem die Essigsäure 20 Stunden einwirkte, lassen sich kaum merkliche Unterschiede gegenüber der Kontrolle finden. Die Schwankungen der Werte liegen innerhalb der Fehlerbreite. Höhere Essigsäurekonzentrationen ließen sich nicht anwenden, da das Serum schon bei etwa 0,4 Prozent gallartige Konsistenz annahm, und dadurch genaue Messungen unmöglich gewesen wären.

Da Hedin ausschließlich mit Serumalbumin arbeitete, so wurden die bezüglichen Resultate auch für die in den vorliegenden Untersuchungen geübte Antitrypsin-Bestimmungsmethode geprüft unter Anwendung von reinem Serum-Albumin Merk. Da dieses Präparat nur sehr geringe Hemmung aufweist, mußte mit bedeutend höheren Konzentrationen gearbeitet werden als in den übrigen Versuchen. In kurzen Umrissen war die Technik folgende:

Aus dem trockenen Serum-Albumin Merk wurden mit physiologischer Kochsalzlösung 2 prozentige Lösungen hergestellt; es entspricht eine solche Lösung annähernd dem Albumingehalt des konzentrierten Serums. Die Lösungen wurden ganz analog den obigen Versuchen mit 0.2 prozentiger Essigsäure bezw. Kochsalzlösung versetzt und für 20 Stunden auf 37° gebracht. Zum Versuch wurden von diesen Stammlösungen 1 prozentige Verdünnungen hergestellt, diese entsprachen also etwa einer 50 prozentigen Serumlösung, und davon 8 ccm für den Versuch verwendet. Zur Kontrolle wurde weiter auch eine frischbereitete Lösung von Albumin Merk in gleicher Konzentration und Menge eingestellt.

Der Versuch ergab bei Digestionsdauer von 1 Stunde:

v = 25.5

Albumin frisch		h = 15.8
Albumin + NaCl	behandelt	h = 17.0
Albumin + Essigsäure		h = 6.0

Es zeigt sich also bei Anwendung von Albumin allein eine ziemliche Abschwächung der Hemmungswirkung durch Essigsäure, wie sie auch aus den Versuchen von Hedin hervorgeht.

Demgegenüber zeigen aber die Versuche mit frischem Serum auffallende Resistenz gegen die Essigsäure. Es scheint also wohl der Eiweißkörper durch die Vorbereitung bei Hedin (Ausfällung und Dialyse) schon bis zu einem gewissen Grade in seiner Widerstandsfähigkeit geschädigt worden zu sein.

Euglobulin.

Im Anschluß an die Eingangs erwähnte Behauptung Mohrs, daß das Antitrypsin an das Euglobulin gebunden sei, wurde auch ein kurzer Versuch mit dieser Fraktion angestellt. Sie wurde durch $^1/_3$ Sättigung mit Ammoniumsulfat erhalten und dann auch die Auswaschung mit $^1/_3$ gesättigter Lösung vollzogen. Nach Fuld und Spiro[11] sind die Fällungsgrenzen des Euglobulins mit Ammoniumsulfat zwischen 28 und 33 Prozent gelegen.

Der Versuch ergab nur, daß wohl der größte Teil der Globulinhemmung auf das Euglobulin zu beziehen ist. Es fanden sich folgende Werte:

Versuch:

Serum: Neurasthenie.

v = 23.4 (N.)

Pferdeserum	h	7.1
Serum	h	12.4
Albuminanteil	h	8.7
Gesamt-Globulinanteil	h	3.8
Euglobulinanteil	h	2.9

Verhalten der Fraktionen gegen Bakterien-Ferment.

Nachdem nunmehr die Verhältnisse der Serumkörper in bezug auf Pankreastrypsin behandelt sind, mag es nicht uninteressant sein, das Verhalten derselben noch ganz kurz mit dem gegen ein Bakterienferment zu vergleichen.

Mit Nutrose konnte keine entsprechende Verdauung erzielt werden, und so mußte wieder Casein an deren Stelle treten. Da mit nicht sehr kräftigen Fermenten gearbeitet wurde, sind die Verdauungszahlen für das Bakterienferment in den angeführten Versuchen wesentlich niedriger als für Pankreastrypsin, und also auch nicht direkt vergleichbar. Es wurden die Versuche auch nur ausgeführt, um das Verhalten gegen beide Fermente einander gegenüberzustellen. Zu dem Zwecke wurde auch immer dasselbe Serum in Parallel-Versuchen einerseits der Pankreas-Trypsin- andererseits der Bakterien-Ferment-Verdauung ausgesetzt. Kämmerer und Mogulesco haben die Verhältnisse in ihrer Arbeit schon eingehend studiert.

[11]) „Ueber die labende und labhemmende Wirkung des Blutes". Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 31, 1900/01.

Zu meinen Versuchen fand eine 6 tägige Gelatinekultur von Mesenthericus vulgaris Benutzung, die in Kölbchen geimpft war. Es wurden 6 ccm des Fermentes verwendet und 14 Stunden verdaut.

Von einer Anzahl von Versuchen seien folgende erwähnt:

Versuch:

Serum: Schrumpfniere.

I. Pankreastrypsin.

v = 24.6

		Digestion 1 Stunde.	(C.)
Pferdeserum		h = 7.2	
Serum	akt.	h = 13.1	
Albuminanteil	akt.	h = 7.3	
Globulinanteil	akt.	h = 4.5	
Serum	inakt.	h = 4.8	
Albuminanteil	inakt.	h = 2.5	
Globulinanteil	inakt.	h = 4.7	

II. Mesentericus-Ferment.

v = 18.2

		Digestion 14 Stunden.	(C.)
Pferdeserum		h = 11.3	
Serum	akt.	h = 11.4	
Albuminanteil	akt.	h = 2.5	
Globulinanteil	akt.	h = 11.4	
Serum	inakt.	h = 10.8	
Albuminanteil	inakt.	h = 2.0	
Globulinanteil	inakt.	h = 11.1	

Das Serum wurde in diesem Doppelversuch vor der Trennung 1 Stunde bei 56° inaktiviert.

Bei Pankreastrypsin erscheinen die bekannten Verhältnisse; gegen das Bakterienferment weist schon das Pferdeserum einen höheren, prozentualen Hemmungswert auf, der ungefähr $^2/_3$ von v ausmacht. Außerdem ist besonders hier und in etwas geringerem Maße auch im folgenden Beispiel auffallend, daß die Werte des Pferdeserums und die des Menschenserums aktiv sich einander sehr nähern, ein Befund, der fast allen ähnlichen Versuchen mit Mesenthericus gleichkommt. Von wesentlichem Einfluß ist dabei freilich auch der niedere Verdauungswert. Weiter entfällt beim Menschenserum nur ein geringer Teil der Hemmung auf das Albumin, während das Globulin eine bedeutende Hemmung aufweist. Nach dem Inaktivieren haben sich die Werte fast nicht geändert, also in allen Teilen eine bedeutende Resistenz gegen Wärme.

Ein anderer Versuch, bei dem erst nach der Trennung in konzentriertem Zustande eine Stunde bei 56° inaktiviert wurde, ist folgender: der zum Teil schon an früherer Stelle angeführt wurde.

Versuch:

Serum: Periostitis luetica.

I. Pankreastrypsin.

v = 17.6 Digestion 1 Stunde. (C.)

Pferdeserum		h = 3.7
Serum	akt.	h = 9.0
Albuminanteil	akt.	h = 6.4
Globulinanteil	akt.	h = 1 4
Serum I	inakt.	h = 0.8
Serum II	inakt.	h = 8.8
Albuminanteil	inakt.	h = 5.3
Globulinanteil	inakt.	h = 1.1

II. Mesentericusferment.

v = 8.1 Digestion 14 Stunden. (C.)

Pferdeserum		h = 3.3
Serum	akt.	h = 2.8
Albuminanteil	akt.	h = 1.1
Globulinanteil	akt.	h = 2.6
Serum I	inakt.	h = 2.5
Serum II	inakt.	h = 2.5
Albuminanteil	inakt.	h = 1.1
Globulinanteil	inakt.	h = 1.5

Wie schon an früherer Stelle erwähnt, wurde in diesem Versuch eine Probe des Serums ohne Zusatz von Ammoniumsulfat inaktiviert (Serum 1). Eine andere, nach Halbsättigung (Serum 2), um den Einfluß zu ermitteln, den das Salz auf die Inaktivierung ausübt. Es ergaben sich dabei ganz bemerkenswerte Resultate, insoferne als bei Trypsin Grübler der Salzzusatz den Rückgang durch Wärmeeinwirkung, der ohne dieselbe (Serum 1) bedeutend ist, fast völlig verhindert hatte (Serum 2). Gegenüber Mesentericus vulgaris zeigt sich kein Unterschied zwischen dem Serum ohne (Serum 1) und dem mit Salzzusatz (Serum 2).

Da die Verhältnisse der Inaktivierung für Pankreastrypsin oben schon erörtert sind, erübrigt hier, kurz hinzuweisen auf die Ergebnisse bei dem Bakterienferment. Soweit eine Beurteilung der wenigen diesbezüglichen Versuche möglich und erlaubt ist, würden sich für Mesentericusferment etwa folgende Tatsachen ergeben:

1. Wenn die Inaktivierung vor der Trennung der Fraktionen erfolgt, so werden beide Komponenten des Serums fast gleichmäßig, wenn auch nur in geringem Grade beeinflußt.

2. Werden dagegen die Fraktionen nach der Ausfällung erwärmt und zwar in einem Zustande, wo das Salz noch in starker Konzentration vorhanden ist, so bleibt das Albumin beinahe unverändert, das Globulin zeigt dagegen einen immerhin beträchtlichen Rückgang: in meinen Versuchen 30—40 Prozent des aktiven Wertes.

Diese letzten Sätze müssen freilich durch eine größere Anzahl von Versuchen erst noch sichergestellt werden.

Zusammenfassung.

1. Gegen Pankreastrypsin hat die Albuminfraktion den Hauptanteil an der Hemmung im nicht inaktivierten Serum. Bei Wärmebehandlung des nativen Serums tritt eine Umkehrung des Verhältnisses ein. Globulin verliert dabei wenig, Albumin stark an Hemmungskraft. Auf die bereits getrennten Eiweißkörper wirkt die Wärme stark ein, wenn die Verdünnung eine hochgradige ist (2prozentige Lösungen), dagegen wenig bei hoher Salzkonzentration ($^1/_2$ gesättigte Ammoniumsulfatlösung).

2. Bei Behandlung des Vollserums mit Aether treten ähnliche Verhältnisse ein, wie bei Wärmeeinwirkung, nämlich auch Umkehrung der Hemmung gegenüber dem aktiven Serum. Nach der Trennung behandelt, zeigen die Fraktionen geringe Resistenz.

3. Ein Versetzen des Vollserums mit 0,2 Prozent Essigsäure beeinflußt selbst bei langer Einwirkung die Hemmung kaum.

4. In stark verdünntem Zustande ertragen Serum und Fraktionen auch eine mehrtägige Aufbewahrung bei Zimmertemperatur, ohne an Hemmungskraft merklich zu verlieren.

5. Der Hauptanteil an der Globulinhemmung scheint dem Euglobulin zuzukommen.

6. Gegen das Bakterienferment (Mesentericus vulgaris) überwiegt im aktiven Serum die Hemmung des Globulins über das Albumin. Nach einstündiger Erwärmung auf 56° sehen wir im Gegensatz zum Pankreasantitrypsin einen nur sehr geringen Rückgang der Hemmungskraft, sowohl des Vollserums als der beiden Eiweißfraktionen.

Zum Schlusse ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Professor Dr. Friedr. v. Müller für die Uebernahme des Referats und Herrn Privatdozent Dr. Kaemmerer für seine liebenswürdige Unterstützung meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

Literatur.

Buchner. Ueber den Einfluß der Neutralsalze auf Serumalexine, Enzyme, Toxalbumine, Blutkörperchen und Milzbrandsporen. Archiv für Hygiene, Bd. 17.

Freund und Joachim. Zur Kenntnis der Serumglobuline. Zeitschr. für physiol. Chemie, Bd. 36.

Friedberger. Ueber das Verhalten der Komplemente in hypertonischen Salzlösungen. Zentralblatt für Bakteriologie, Bd. 46.

Fuld und Spiro. Ueber labende und labhemmende Wirkung des Blutes. Zeitschr. für physiol. Chemie, Bd. 31.

Hedin. Ueber Aufnahme von Typsin durch verschiedene Substanzen. Zeitschr. für physiol. Chemie, Bd. 50.

Ders. Ueber verschiedenartige Hemmung der typhischen Verdauung. Zeitschr. für physiol. Chemie, Band 52.

Ders. Weiteres über die Kenntnis der Enzymwirkungen. Zeitschr. für physiol. Chemie, Bd. 64.

Kämmmerer. Studien über die Antitrypsine des Serums. Deutsches Archiv für klin. Medizin, Bd. 103.

Kämmerer und Mogulesko. Ueber die Antitrypsine des Serums gegen Pancreas-, Hefe- und Pyocyaneustrypsin. Zeitschr. für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie, Bd. 12.

Landsteiner. Zur Kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkung des Blutserums und der Lymphe. Zentralblatt für Bakteriologie, Bd. 27.

Marcus. Beitrag zur Antifermentwirkung des menschlichen Blutes. Berliner Klin. Wochenschrift, 1908, Nr. 14.

Mohr. Ueber Untersuchungen des mütterlichen und kindlichen Serums in seiner antitryptischen Wirkung. Dissertation Würzburg, 1907.

Moll. Ueber künstliche Umwandlung von Albumin in Globulin. Hofmeisters Beiträge, Bd. 4.

Oppenheimer. Die Fermente. Leipzig 1909.

Wiener. Ueber quantitative Globulinbestimmungen mittels Ammoniumsulfat und über Reindarstellung von Globulinen. Zeitschr. für physiol. Chemie, Bd. 74.

Lebenslauf.

Ludwig Aubry, geboren am 28. September 1886 zu München, als der Sohn des verstorbenen kgl. Professors, Direktors der wissenschaftlichen Station für Brauerei in München Louis Aubry und dessen Gattin Marie, geb. Messerer, besuchte daselbst die Volksschule und das kgl. Luitpoldgymnasium, nach dessen Absolvierung er im Wintersemester 1907—1908 seine medizinischen Studien an der kgl. Ludwig-Maximilians-Universität begann. Ostern 1910 legte er die ärztliche Vorprüfung und im Wintersemester 1912—1913 die ärztliche Prüfung daselbst ab. Seit Januar 1913 ist er als Medizinalpraktikant an der 2. med. Abteilung des Krankenhauses München-Schwabing tätig.